



SETAC – Brazil

## Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*

M. B. MASUTTI,<sup>1\*</sup> E. L. G. ESPÍNDOLA,<sup>2</sup> A. DE M. NOGUEIRA<sup>3</sup> & F. C. F. SIMÕES<sup>4</sup>

<sup>1,2,3</sup>NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP, Av. Trabalhador Sancarlense, 400, Centro, CEP 13566-590, São Carlos, SP

<sup>4</sup>IQSC/USP

### RESUMO

Poucos trabalhos sobre a sensibilidade de organismos aquáticos a contaminantes ambientais são realizados utilizando-se espécies comuns aos ecossistemas brasileiros. *Oreochromis niloticus* é uma espécie amplamente distribuída em reservatórios, assim como *Pistia stratiotes*, tratando-se das espécies de peixe e macrófita, respectivamente, mais abundantes na represa do Lobo. O objetivo deste trabalho foi determinar as faixas de sensibilidade a Cu e Cr para essas duas espécies. As soluções-teste foram preparadas com água de cultivo para os peixes e com água da represa para as macrófitas, a partir de soluções-estoque de  $K_2Cr_2O_7$  e  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ . A  $CL_{50}$  foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber após 96 h de exposição para os peixes e a  $CE_{50}$ , após 168 h para as macrófitas. Foram avaliadas as seguintes características nos indivíduos de *P. stratiotes*: altura, diâmetro, número de folhas e número de raízes. Os valores de  $CL_{50}$  para Cr obtidos com os indivíduos de *O. niloticus* variaram entre 107,2 e 164 mg/L, e os valores para Cu variaram de 0,32 a 0,65 mg/L. Os valores de  $CE_{50}$  de Cr determinados nos testes com *P. stratiotes* variaram entre 22,4 e 33,7 mg/L, avaliando-se tanto o número de folhas como o número de raízes. Nos testes com cobre esses valores variaram entre 0,2 e 0,3 mg/L, considerando-se o número de raízes. Ambas as espécies testadas apresentaram maior sensibilidade ao Cu que ao Cr, e os valores de  $CL_{50}$  obtidos para os peixes e de  $CE_{50}$  obtidos para as macrófitas foram superiores aos determinados em outros trabalhos para espécies de diferentes níveis tróficos, sugerindo que essas espécies não são indicadas para uso como organismos-teste, ao menos considerando-se os parâmetros de efeito avaliados.

*Palavras-chave:* cromo, cobre, *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*.

### ABSTRACT

#### *Oreochromis niloticus* and *Pistia Stratiotes* sensibility to copper and chromium

A few works about aquatic organisms sensibility to environmental contaminants are conducted using species common to Brazilian ecosystems. *Oreochromis niloticus* is a widespread species in reservoirs, as *Pistia stratiotes*, being the fish and macrophyte species, respectively, most abundant in Lobo reservoir. The aim of this work was to determine the sensibility range to Cr and Cu to this species. The  $LC_{50}$  was calculated by the Trimmed Spearman-Kärber method, after 96 h of exposition to fish, and the  $EC_{50}$  after 168 h to macrophytes. The follow characteristics were measured in *P. stratiotes* individuals: height, diameter, number of leaves and number of roots. The  $LC_{50}$  values range to Cr obtained with the individuals of *O. niloticus* was 107.2-164 mg/L, and the values to Cu ranged between 0.32 and 0.65 mg/L. The  $EC_{50}$  values to Cr determined in the *P. stratiotes* tests ranged from 22.4 to 33.7 mg/L, as to the leaves number estimation as to the roots number estimation. In the tests with Cu, these values ranged between 0.2-0.3 mg/L, considering the roots number. Both the species tested were more sensible to Cu than to Cr, and the  $LC_{50}$  values obtained to the fish and the  $EC_{50}$  values obtained to the macrophytes were higher than the values determined by other works to different trophic level organisms, suggesting that the species studied in this work are not indicate to use as test organism, at least considering the effect parameters evaluated.

*Key words:* chromium, copper, *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*.

\*Corresponding author: Mariana Beraldo Masutti, e-mail: mariana.masutti@itelefonica.com.br.

## INTRODUÇÃO

Os testes de toxicidade apresentam-se como mecanismos para a compreensão dos efeitos de impactos sobre os compartimentos bióticos, utilizando-se organismos vivos que atuam como biossensores, e podem prever antecipadamente impactos de determinado poluente sobre a biota. Esses testes podem avaliar a toxicidade relativa de diversos agentes químicos para uma ou diversas espécies e a sensibilidade dessas espécies ao agente tóxico. São importantes ainda na determinação de concentrações seguras de agentes químicos para a preservação da vida aquática e para a qualidade das águas e sedimentos. O objetivo geral de um teste de toxicidade é a caracterização da resposta ecológica a determinada substância ou elemento químico.

Em muitos casos, testes de toxicidade são conduzidos com organismos que podem ser facilmente obtidos, cultivados e testados, sendo a relevância ecológica dessas espécies uma consideração secundária (Chapman, 2002). Os organismos mais utilizados na avaliação da toxicidade de substâncias são as algas e o zooplâncton, porém uma grande variedade de outros organismos aquáticos são comumente usados em testes de toxicidade, incluindo invertebrados (espécies de *Daphnia*, *Gammarus*, *Brachionus*, *Ceriodaphnia*), peixes (*Poecilia* sp., *Leponis macrochirus*, *Danio rerio*, *Pimephales promelas*, *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*) e algas (*Selenastrum*, *Chlorella*, *Microcystis*, *Navicula*).

A utilização de peixes em testes de toxicidade é bem documentada e normatizada por diversas agências reguladoras (USEPA, 2002; ABNT, 1993; entre outras). Peixes são considerados bons indicadores de toxicidade devido à sua importância ecológica e comercial. No Brasil, estudos sobre a toxicidade do Cu foram realizados com *Prochilodus scrofa* (Mazon et al., 2000; Carvalho, 2003) e *Danio rerio* (Oliveira-Filho et al., 2004).

Apesar de não se tratar de uma espécie nativa, *Oreochromis niloticus* é amplamente distribuída nos reservatórios brasileiros e cultivada em piscicultura, sendo muito utilizada na alimentação humana. A maioria dos trabalhos realizados com *O. niloticus* está relacionada ao estresse oxidativo induzido pela exposição a substâncias tóxicas ou efluentes (Ribeiro et al., 2000; Tagliari et al., 2004), pela bioacumulação de metais (Clearwater et al., 2002; Çogun & Kargm, 2004) e por técnicas de cultivo e alimentação (Pan et al., 2003; Çogun & Kargm, op. cit.). Apesar de Cu e Cr serem utilizados em rações como suplemento alimentar para *O. niloticus* (Pan, op. cit.; Clearwater, op. cit.), diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos tóxicos desses metais em peixes.

*Pistia stratiotes* é uma planta aquática flutuante, sem caule, que pode atingir até 25 cm de diâmetro, nativa da América Tropical e amplamente distribuída por todo o Brasil. Os trabalhos realizados com *P. stratiotes* referem-se à sua distribuição, composição química (Klump et al., 2002) e utilização em "wetlands" construídas para tratamento de efluentes (Cervantes

et al., 2001). A utilização dessas plantas como biorremediadores no tratamento de águas residuárias e como indicadores de contaminação ambiental é mais comum que seu uso em testes de toxicidade. Nos testes de toxicidade com *P. stratiotes*, é mais comum a verificação da ocorrência de bioacumulação como parâmetro de efeito (Maine et al., 2004; Klump, op. cit.).

Sobre a toxicidade de metais para *P. stratiotes* há poucos dados disponíveis. *Pistia* apresenta características morfológicas mais adequadas que *Lemna*, espécie normatizada para utilização em testes de toxicidade (USEPA, 1996), nos estudos em fisiologia e bioquímica (Tarlyn et al., 1998), além de se reproduzir por brotos, possibilitando a utilização de plantas geneticamente idênticas. Testes de toxicidade com macrófitas normalmente são realizados com *Lemna* sp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Oreochromis niloticus*

Indivíduos juvenis com comprimento médio de 4,1 cm e peso médio de 0,6 g foram coletados de tanques de cultivo mantidos pelo CRHEA-USP. Após a coleta, os peixes foram mantidos em laboratório em meio ASTM, com dureza entre 40 e 48 mg Ca-Mg/L e pH entre 7,2 e 7,6, até realização dos testes. Os peixes não foram alimentados nas 24 h anteriores à realização dos testes.

Os testes foram realizados baseando-se na metodologia descrita pela norma NBR 12714:1993 (ABNT, 1993), em duplicata, utilizando 2 litros de solução por réplica, mantendo-se uma proporção de 1 g de peixe por litro de solução. A CL<sub>50</sub> 96 h foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977).

Com base nos testes de sensibilidade para *Danio rerio* realizados rotineiramente no laboratório de Ecotoxicologia do NEEA/CRHEA/USP, que utiliza K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, foi determinada a primeira faixa de concentração testada para Cr com *O. niloticus*. As concentrações-teste (60, 90, 120, 150 e 180 mg/L Cr) foram preparadas com água de cultivo, a partir de soluções-estoque de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, com concentração de Cr 1 g/L em água destilada.

Com base em dados de CL<sub>50</sub> reportados pela literatura para outros peixes (Mazon et al., 2000; Carvalho, 2003; Oliveira-Filho et al., 2004), foi escolhida a faixa de concentrações a ser testada (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 mg/L de Cu). As soluções foram preparadas em meio de cultivo a partir de uma solução-estoque de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, contendo 1 g Cu/L, preparada em água destilada.

### *Pistia stratiotes*

Os indivíduos de *P. stratiotes* utilizados nos testes foram coletados manualmente na represa do Lobo. Após a coleta, as macrófitas foram mantidas em aquário, no laboratório de Ecotoxicologia, com água proveniente do mesmo local onde foram coletadas as plantas. Foram mantidos indivíduos adultos, que apresentavam brotos, os quais foram retirados no dia da

montagem dos testes. Todas as plantas tiveram as folhas e raízes lavadas para a retirada de lagartas e pulgões. Antes da montagem dos testes, todos os indivíduos tiveram as raízes cortadas e a biometria determinada. A metodologia utilizada foi adaptada a partir das metodologias utilizadas em testes com *Lemna* sp. (USEPA, 1996): o teste seguiu o mesmo desenho dos testes com *Lemna* sp., porém, como o ciclo de vida de *P. stratiotes* é mais longo, outros parâmetros de efeito, diferentes de número de frondes e letalidade, foram investigados, como o comprimento e número das raízes.

Os indivíduos utilizados nos testes apresentavam 5-6 cm de altura e entre 3 e 5 folhas. Os testes foram montados em recipientes plásticos com 2 litros de capacidade, e em cada recipiente foram adicionados 5 indivíduos em 1 litro de solução. Os testes foram realizados em triplicata, com 3 concentrações mais um controle para cada metal.

Foram avaliadas as seguintes características após 168 h de exposição: altura, diâmetro, número de folhas e número de raízes. A  $CE(I)_{50}$  168 h foi calculada através do método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Foram considerados como parâmetros de efeito o número de folhas final em comparação com o número de folhas inicial e o número de raízes desenvolvidas durante o tempo de exposição, reportando os efeitos como inibição em relação ao controle.

As concentrações de Cr utilizadas nos testes com *P. stratiotes* foram baseadas em dados apresentados pela literatura (Kahkonen & Manninen, 1998; Vajpayee *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2000) em testes com outras macrófitas, como *Lemna* sp., *Nelumbo nucifera* e *Elodea canadensis*. As soluções foram preparadas a partir de água coletada na represa do Lobo, no mesmo local onde foram coletadas as macrófitas. As concentrações-teste utilizadas em dois testes preliminares foram 1, 5 e 10 mg/L de Cr, sendo que nenhum efeito foi observado, comparando-se com o controle. Em seguida foram realizados 2 testes com concentrações iguais a 10, 50 e 100 mg/L Cr e um teste com concentrações de 10, 20, 40, 60 e 80 mg/L Cr.

As soluções de Cu foram preparadas a partir da água coletada na represa do Lobo, mesmo local onde foram coletadas as macrófitas. As concentrações-teste utilizadas nos dois primeiros testes foram 1, 5 e 10 mg/L, tendo ocorrido senescência completa nas plantas expostas à concentração mais alta. Foram realizados, então, 3 testes com concentrações mais baixas, entre 0,1 e 1,0 mg/L, sendo em dois deles utilizadas 3 concentrações (0,1; 0,5; e 1,0 mg/L) e no último 5 concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; e 1,0 mg/L Cu).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Oreochromis niloticus*

Os valores de  $CL_{50}$  obtidos para Cr com os indivíduos de *O. niloticus* variaram entre 107,2 e 164 mg/L. Apesar do pequeno número de réplicas entre os testes, os valores de  $CL_{50}$  determinados apresentaram valores de desvio-padrão e

coeficiente de variação iguais a 27 mg/L e 20%, respectivamente. Esses valores são relativamente altos, considerando-se um desvio-padrão aceitável de 20%.

A  $CL_{50}$  média determinada neste trabalho para *O. niloticus* é um pouco superior às reportadas pela literatura para outros peixes, como *Pimephales* sp., sugerindo a tolerância dessa espécie ao metal em questão. Os valores de  $CL_{50}$  de dicromato de potássio para peixes variam bastante em função das espécies utilizadas (Tabela 1), sendo o Cr considerado pouco tóxico para peixes, não apresentando toxicidade aguda nas concentrações ambientais (Orme & Kegley, 2004). Apesar da aparente baixa toxicidade do Cr, valores entre 0,28 e 0,33 mg/L de dicromato de potássio são reportados como  $CL_{50}$  para *O. niloticus*, considerando a inibição no crescimento como efeito.

Os valores de  $CL_{50}$  de Cu obtidos com os indivíduos de *O. niloticus* variaram de 0,32 a 0,84 mg/L de Cu (Tabela 1). *O. niloticus* apresentou sensibilidade muito maior ao Cu que ao Cr, e comparando-se os valores determinados para *O. niloticus* com os reportados para outros peixes, como *Prochilodus scrofa*, *Cichlasoma facetum* e *Pimephales* sp. (Tabela 2), essa espécie é bastante sensível ao Cu, porém, *O. niloticus* mostrou-se muito menos sensível ao Cu que *Danio rerio*, espécie normatizada para testes de toxicidade pela ABNT (ABNT, 2003).

### *Pistia stratiotes*

Dentre os parâmetros avaliados, o desenvolvimento de folhas e raízes foram os melhores indicadores de efeito para os contaminantes estudados. Assim, a  $CE_{50}$  168 h foi calculada em função desses parâmetros, utilizando valores referentes ao aumento no número de folhas, ao número de raízes desenvolvidas e ao comprimento médio dessas raízes no período de exposição aos contaminantes.

Os valores médios de  $CE_{50}$  de Cr variaram entre 30,5 e 36,5 mg/L (Tabela 3). Esses valores são um pouco maiores que os valores tóxicos para *P. stratiotes* reportados por Orme & Kegley (2004), variando de 1 a 20 mg/L, com base em efeitos bioquímicos, histológicos e mortalidade.

O desenvolvimento de raízes foi estimulado pela adição de Cu na concentração mais baixa de cada teste. Os valores de  $CE_{50}$  variaram de 0,18 a 0,47 mg/L de Cu para o número de raízes e de 0,46 a 0,52 mg/L de Cu para o comprimento médio das raízes (Tabela 4). Para o número de folhas, a  $CE_{50}$  só pode ser calculada em um dos testes. *P. stratiotes* aparenta ser mais sensível que *Lemna* sp. ao Cu. Valores reportados pela literatura de  $CE_{50}$  para *Lemna minor*, em testes de 5 dias, são da ordem de 2 mg/L (Orme & Kegley, 2004).

Entre os parâmetros utilizados nos cálculos de  $CE_{50}$ , o comprimento das raízes foi o que gerou os menores valores para desvio-padrão e coeficiente de variação. Os valores de  $CE_{50}$  calculados para cada um dos parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre si (ANOVA,  $p < 0,05$ ), tanto para os testes com Cr quanto para os testes com Cu.

**Tabela 1** — Valores médios de CL<sub>50</sub> de Cr e Cu para *O. niloticus* (n = 5 réplicas).

	Cr (mg/L)	Cu (mg/L)
CL <sub>50</sub> 96 h (média)	133,5	0,59
Faixa de sensibilidade	(79,5-187,5)	(0,21-0,96)
Desvio-padrão	27,0	0,19
Coefficiente de variação	20,2	32

**Tabela 2** — Valores de CL<sub>50</sub> 96 h de Cu e Cr para diferentes espécies de peixes.

Espécies	CL <sub>50</sub> mg/L Cr	CL <sub>50</sub> mg/L Cu	Referência
<i>Danio rerio</i>		0,083-0,152	Oliveira-Filho <i>et al.</i> , 2004
<i>Prochilodus scrofa</i>		0,014-0,098	Carvalho, 2003
<i>Cichlasoma facetum</i>	20,7	1,4	Rossini & Ronco, 2001
<i>Pimephales</i> sp.	10-109		Rossini & Ronco, 2001
<i>Pimephales</i> sp.		0,1-84	Rossini & Ronco, 2001
<i>Oreochromis niloticus</i>	133,5	0,59	Este trabalho

**Tabela 3** — Valores de CE<sub>50</sub> 168 h (mg/L Cr) para *P. stratiotes* (n = 5 réplicas).

	Número de raízes	Número de folhas	Comprimento das raízes
CE <sub>50</sub> média	36,5	31,8	30,5
Faixa de sensibilidade	(0-80,3)	(14,5-49,1)	(24-37,0)
Desvio-padrão	21,9	8,7	3,3
Coefficiente de variação	60,1	27,2	10,7

**Tabela 4** — Valores de CE<sub>50</sub> 168 h (mg/L Cu) para *P. stratiotes* (n = 5 réplicas).

	Número de raízes	Número de folhas	Comprimento das raízes
CE <sub>50</sub> média	0,37	0,42	0,50
Faixa de sensibilidade	0,043-0,69	*	0,43-0,56
Desvio-padrão	0,16	*	0,03
Coefficiente de variação	44,17	*	6,47

\*Valores não calculados.

De forma geral, o número de raízes desenvolvidas e o comprimento dessas raízes apresentaram sensibilidade similar nos testes realizados, enquanto o número de folhas parece não ser um bom parâmetro de efeito.

As maiores dificuldades encontradas na realização dos testes de toxicidade com *P. stratiotes* foram a obtenção de número de indivíduos suficiente para a realização de cada teste que apresentassem características semelhantes, como número de folhas e relação altura/diâmetro, e a isenção desses indivíduos de lagartas e pulgões antes da utilização nos testes. Uma alternativa para eliminar esses efeitos seria o cultivo das plantas em laboratório. Culturas axênicas de *Pistia* apresentam indivíduos de menor tamanho, morfologia complexa representativa, alta taxa de crescimento, facilidade de manipulação e hábito de crescimento por clones, sendo em geral mais uniformes que plantas não axênicas, não apresentando alterações morfológicas e fisiológicas mesmo após muitas subculturas (repicagens) (Tarlyn *et al.*, 1998).

## CONCLUSÕES

Ambas as espécies estudadas foram mais sensíveis ao Cu que ao Cr e apresentaram sensibilidade similar para Cu, considerando-se os valores de  $CL_{50}$  e  $CE_{50}$  obtidos. Cromo foi mais tóxico para *P. stratiotes* que para *O. niloticus*, apresentando efeitos sobre essa espécie de macrófita em concentrações muito menores que as determinadas como letais para os peixes.

Os resultados apontam que *O. niloticus* é uma espécie adequada para a utilização em testes de toxicidade, apresentando sensibilidade similar a outros peixes utilizados em testes de toxicidade para Cr e Cu, como *Pimephales* sp., além de apresentar a vantagem de se tratar de uma espécie amplamente distribuída em reservatórios. Os testes realizados com *P. stratiotes* foram bastante reprodutíveis, com pequena variabilidade entre os valores de  $CE_{50}$  obtidos. Considerando a sensibilidade da espécie aos metais testados, maior que a reportada para *Lemna*, e a possibilidade de cultivo em laboratório, gerando indivíduos mais homogêneos, *P. stratiotes* também apresenta as características necessárias para sua utilização em testes de toxicidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 1993, *NBR 12715 – Água, ensaio de toxicidade aguda com peixes*. Parte I – Sistema Estático. Rio de Janeiro.
- CARVALHO, C. S., 2003, Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e no fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Tese de Doutorado, PPG ERN, UFSCar, São Carlos, 106p.
- CHAPMAN, P. M., 2002, Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 7-15.
- CERVANTES, C., CAMPOS-GARCÍA, J., DEVARS, S., GUITIÉRREZ-CORONA, F., LOZA-TAVERA, H., TORRES-GUZMÁN, J. & MORENO-SANCHÉZ, R., 2001, Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology reviews*, 25: 335-347.
- CLEARWATER, S. J., FARAG, A. M. & MEYER, J. S., 2002, Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 132: 269-313.
- ÇOĞUN, H. Y. & KARGM, F., 2004, Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 55: 277-282.
- GUITIÉRREZ, P. A., ONGAY, J. P. & VERCESI, M. L., 2000, Efectos de Cr (VI) sobre los umbrales experimentales y biológicos de tres especies de *Lemna* (Angiospermae: Lemnaceae): una aproximación comparativa. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer, L., A. Oliveira Neto. *Ecotoxicologia: perspectivas para o Século XXI*. RiMa Editora, São Carlos, pp. 309-314.
- KÄHKÖNEN, M. A. & MANNINE, P. K. G., 1998, The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea canadensis* at different nickel and chromium exposure levels. *Chemosphere*, 36(6): 1381-1390.
- HAMILTON, M. *et al.*, 1977, Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*, 11(7): 714-719.
- KLUMPP, A., BAUER, K., FRANZ-GERSTEIN, C. & MENEZES, M., 2002, Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). *Environmental International*, 28: 165-171.
- MAINE, M. A., SUÑE, N. L. & LAGGER, S., 2004, Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research*, in press.
- MAZON, A. F., PINHEIRO, G. D. H. & FERNANDES, M. N., 2000, Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial à biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em Curimatá, *P. scrofa* (Tleostei, Prochilodontidae). In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer, L., A. Oliveira Neto. *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*, RiMa Editora, São Carlos, pp. 327-342.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C., LOPES, R. M. & PAUMGARTTEN, F. J. R., 2004, Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 56: 369-374.
- ORME, S. & KEGLEY, S., 2004, *PAN Pesticide Database*. Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. 2004). Disponível em: <http://www.pesticideinfo.org>.
- PAN, Q., LIU, S., TAN, Y. G. & BI, Y. Z., 2003, The effect of chromium piclinate on growth and carbohydrate utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 225: 421-429.
- RIBEIRO, L., TRIBESS, T., TORRES, M. A., SOARES, C. H. L., PEDROSA, R. C., AGOSTINI, J., BUENO, A. & WILHEM FILHO, D., 2000, Estresse oxidativo em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta ao efluente de indústria têxtil. In: E. L. G. Espíndola, C. M. R. Botta-Paschoal, O. Rocha, M. B. C. Bohrer & L. A. Oliveira Neto. *Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI*. RiMa Editora, São Carlos, pp. 441-449.
- ROSSINI, G. D. B. & RONCO, A. E., 2001, Sensibilidad de *Cichlasoma facetum* (Ciclididae, Pisces) a metais pesados. In: J. Herkovits (ed.), *Toxicología y química ambiental*. Contribuciones para un Desarrollo Sustentable, 8-10. Setac LA, Buenos Aires.
- TAGLIARI, K. C., VARGAS, V. M. F., ZIMIANI, K. & CECCHINI, R., 2004, Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17: 149-157.

TARLYN, N. M., KOSTMAN, T. A., NAKATA, P. A., KEATES, S. E. & FRANCESCHI, V. R., 1998, Axenic cultures of *Pistia stratiotes* for use in plant biochemical studies. *Aquatic Botany*, 60: 161-168.

VAJPAYEE, P., SHARMA, S. C., TRIPATHI, R. D., RAI, U. N. & YUNUS, M., 1999, Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* GAERTN. *Chemosphere*, 39(12): 2159-2169.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996, *Ecological effects test guidelines OPPTS 850.4400 aquatic plant toxicity test using Lemna spp.*, Tiers I and II.

U.S. EPA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002, *EPA- 821-R-02-012 Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Fifth Edition, Washington.